

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

**B7**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12Q 1/68, C12P 19/34</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/15698</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 1. April 1999 (01.04.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/06006 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 21. September 1998 (21.09.98) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 41 714.0 22. September 1997 (22.09.97) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> INSTITUT FÜR MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> ELLINGER, Thomas [DE/DE]; Ottogerd-Mühlmann-Strasse 19, D-07743 Jena (DE). EHRICHT, Ralf [DE/DE]; Obere Lindenbergrasse 40, D-09306 Rochlitz (DE). <b>(74) Anwalt:</b> MAIWALD, Walter; Maiwald GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, D-80335 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR SYNTHESISING AND AMPLIFYING NUCLEIC ACIDS <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR SYNTHESE UND AMPLIFIKATION VON NUKLEINSÄUREN <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a method for synthesising and amplifying nucleic acids by means of an enzyme-catalysed reaction wherein a nucleic acid is copied on the basis of a single-stranded initiator nucleic acid without said initiator nucleic acid hybridising with the nucleic acid being copied. According to the inventive method, a linear nucleic acid is copied on the basis of an initiator nucleic acid with a single-stranded area at least at the 3' end, through the activity of a polymerase. The initiator nucleic acid does not need to be homologous with the nucleic acid being copied.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese und Amplifikation von Nukleinsäuren mittels einer Enzym-katalysierten Reaktion, bei der eine Nukleinsäure ausgehend von einer einzelsträngigen Initiatornukleinsäure kopiert wird, ohne daß eine Hybridisierung der Initiatornukleinsäure an die zu kopierende Nukleinsäure stattfindet. Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren, bei dem eine lineare Nukleinsäure ausgehend von einer zumindest am 3'-Ende einen einzelsträngigen Bereich aufweisenden Initiatornukleinsäure durch die Aktivität einer Polymerase kopiert wird, wobei die Initiatornukleinsäure keine Homologie mit der zu kopierenden Nukleinsäure aufweisen muß.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Synthese und Amplifikation von Nukleinsäuren

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese und Amplifikation von Nukleinsäuren mittels einer Enzym-katalysierten Reaktion, bei der eine Nukleinsäure ausgehend von einer einzelsträngigen Initiatornukleinsäure kopiert wird, ohne daß eine
- 10 Hybridisierung der Initiatornukleinsäure an die zu kopierende Nukleinsäure stattfindet. Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren, bei dem eine lineare Nukleinsäure ausgehend von einer zumindest am 3'-Ende einen einzelsträngigen Bereich aufweisenden
- 15 Initiatornukleinsäure durch eine Polymerase-Aktivität kopiert wird, wobei die Initiatornukleinsäure keine Homologie mit der zu kopierenden Nukleinsäure aufweisen muß. Die diesem Verfahren zugrundeliegende Reaktion wird im folgenden als Initiator-gesteuerte Amplifikation (initiator-directed amplification, IDA) bezeichnet.
- 20

Die Prozesse der DNA-Replikation, DNA-Ligation und RNA-Transkription und das zunehmende Wissen um die diesen

25 Prozessen zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen und -prinzipien haben die Basis für verschiedene *in vitro*-Nukleinsäureamplifikationsstrategien geliefert.

Die zuerst realisierte Methode, allgemein als

30 Polymerasekettenreaktion (polymerase-chain-reaction, PCR) bekannt, basiert auf einer DNA-Polymerase-katalysierten Replikation beider Stränge einer Target-DNA-Sequenz, die durch zwei mit der Target-DNA-Sequenz homologe Oligonukleotidprimer initiiert wird. Dabei

35 wird die Reaktionstemperatur zyklisch variiert, um die Denaturierung des DNA-Templates, gefolgt durch die Hybridisierung der Primer an die Targetsequenz und schließlich die Polymerase-katalysierte DNA-Synthese zu erlauben. Diese *in vitro*-Amplifikationstechnik verlangt

- 2 -

somit neben einem speziellen, zyklischen Temperatur-  
regime die Hybridisierung spezifischer Oligonukleotid-  
primer an eine spezifische DNA-Templatesequenz. Die in  
vitro-Amplifikation mittels PCR sowie Modifikationen  
5 und Weiterentwicklungen dieser Reaktion sind vielfach  
beschrieben worden, beispielsweise in Saiki, R.K. et  
al. (1985) Science 230, 1350-1354; Mullis, K.B. and  
Faloona, A. (1987) Methods Enzymol. 155, 335-350; EP-  
A2-0 200 362.

10

Eine andere Amplifikationsmethode, genannt Ligaseket-  
tenreaktion (ligase-chain-reaction, LCR), beruht wie  
die oben erwähnte PCR auf einem thermozyklischen  
Prozeß, wobei im Fall der LCR Ligationsprodukte von  
15 zwei Paaren von komplementären Oligonukleotiden  
akkumulieren. Wie bei der PCR müssen auch hier  
Oligonukleotidprimer eingesetzt werden, deren Sequenz  
mit der Sequenz der Templatenukleinsäure identisch oder  
zumindest im wesentlichen identisch ist, so daß eine  
20 spezifische Hybridisierung der Primer an die zu  
amplifizierenden Sequenzabschnitte stattfinden kann.  
Die LCR-Methode, mittels derer ausschließlich die durch  
die hinzugefügten Oligonukleotide repräsentierten  
Sequenzen amplifiziert werden können, ist ausführlich  
25 beschrieben worden, inter alia, in Barany, F. (1991)  
PCR Methods Appl. 1, 5-16; EP-A2-0 439 182.

Aus WO 90/01069 ist darüber hinaus eine Amplifikations-  
methode (P&LCR) bekannt, die die Merkmale der PCR und  
30 der LCR in sich vereinigt, also auf Polymerase- und auf  
Ligase-katalysierten Reaktionen beruht.

Während es sich bei PCR, LCR und P&LCR um thermo-  
zyklische Amplifikationsmethoden handelt, gelang es  
35 mittlerweile, auch isothermale Strategien in die Praxis

- 3 -

- umzusetzen. Hier sind insbesondere die "self-sustained sequence replication" (3SR), beschrieben u.a. in Guatelli, J.C. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874-1878; Fahy, E. et al. (1991) PCR Methods Appl. 1, 25-33; EP-A2-0 373 960 und WO 92/08800, und die "nucleid acid sequence-based amplification" (NASBA), beschrieben u.a. in Compton, J. (1991) Nature 350, 91-92, zu erwähnen.
- 10 Sowohl die 3SR- als auch die NASBA-Strategie basieren auf in Retroviren beobachteten Replikationsprinzipien. In beiden Fällen initiiert die Hybridisierung eines zu dem 3'-Ende einer Target-RNA-Sequenz komplementären Primers eine Reverse Transkriptase-katalysierte DNA-
- 15 Synthese (first strand cDNA synthesis). Im nachfolgenden Schritt wird das RNA-Template durch die Aktivität der RNase H aus *Escherichia coli* abgebaut, wodurch einem zweiten Primer, der an seinem 5'-Ende die Erkennungssequenz für eine virale RNA-Polymerase,
- 20 beispielsweise T7-RNA-Polymerase, umfaßt, die Hybridisierung an das neusynthetisierte cDNA-Molekül ermöglicht wird. Nachdem der DNA-Doppelstrang durch die Aktivität der Reverse Transkriptase (second strand cDNA synthesis) vervollständigt worden ist und auch die T7-
- 25 Promotorregion doppelsträngig vorliegt, synthetisiert die RNA-Polymerase zahlreiche RNA-Moleküle, deren Sequenz der der ursprünglichen Target-RNA entspricht und die wiederum als Template in nachfolgenden Amplifikationszyklen dienen. Auf diese Weise resultiert der
- 30 spontane Wechsel zwischen Reverse Transkriptase-, RNase H- und RNA-Polymerase-katalysierten Reaktionen bei einer festgesetzten Temperatur in einer exponentiellen Amplifikation der Targetsequenz.

- 4 -

Eine weitere isothermale Amplifikationsmethode ist die als "strand displacement amplification" (SDA) bezeichnete Technik von Walker, G.T. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20, 1691-1696 und Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 392-396; vgl. auch EP-A1-0 497 272 und EP-A2-0 500 224. In dieser Strategie wird das den isothermalen Amplifikationsmethoden anhaftende Problem der Strangdissoziation der gebildeten Nukleinsäureduplexes durch die Verdrängung ("Displacement") des komplementären DNA-Stranges von der Targetsequenz während der Synthese eines neuen Stranges gelöst. Auch im Falle der SDA-Methode hybridisiert ein mit der Targetsequenz komplementärer Oligonukleotidprimer an einen Strang der zu Beginn denaturierten Target-DNA. Anschließend verlängert eine DNA-Polymerase, vorzugsweise das große Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* mit 5'-Exonukleasedefizienz (Exo<sup>-</sup> Klenow), sowohl den Primer als auch das Templatemolekül durch Kopieren des 5'-Endes des Primers, der an seinem 5'-Ende eine bestimmte Restriktionsschnittstelle umfaßt. Da während der DNA-Synthese bestimmte modifizierte dATP-Nukleotide angeboten und eingebaut werden, ist nach Zugabe der speziellen Restriktionsendonuklease nur die im Primer enthaltene Schnittstelle für einen Restriktionsverdau, nicht aber die DNA-Kopie für eine Restriktionsverdau zugänglich (sog. Hemirestriktion). An diesem "nick" wird durch die DNA-Polymerase, die nicht zur Nicktranslation befähigt ist, die DNA-Synthese initiiert und der nicht als Template dienende Strang durch Strangdisplacement während der DNA-Synthese abgelöst.

Aus WO 90/10064, 91/03573 und 91/16446, vgl. auch Blanco et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12198-12202, ist eine weitere isothermale DNA-Amplifikationsmethode bekannt, bei der DNA-

- 5 -

Replikationsproteine des Bakteriophagen  $\phi 29$  eingesetzt werden und mit deren Hilfe auch sehr lange DNA-Segmente (> 70 kb) amplifiziert werden können. Dieses Verfahren erfordert u.a. die Anwesenheit eines sog. terminalen Proteins (TP) von  $\phi 29$ , das als Primer wirkt, einer DNA-Polymerase von  $\phi 29$  und weiterer Replikationsproteine, wie SSB (single-stranded DNA-binding protein) und DBP (double-stranded DNA-binding protein). Bei dieser Amplifikationsmethode findet im Unterschied zu den oben beschriebenen Verfahren eine Hybridisierung spezifischer Oligonukleotide an die zu kopierende Nukleinsäure nicht statt, als Primer dient stattdessen das terminale Protein (TP) aus  $\phi 29$ .

Aus Kramer, F.R. und Lizarde, P.M. (1989) Nature 339, 401-402 und Lomeli, H. (1989) Clin. Chem. 35, 1826-1831 ist des weiteren eine isothermale RNA-Amplifikationsmethode bekannt, bei der eine RNA-abhängige RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen  $Q_\beta$  ( $Q_\beta$ -Replikase) eingesetzt wird. Die in diesem Verfahren verwendeten RNA-Sonden enthalten die für die Replikation durch  $Q_\beta$ -Replikase erforderlichen Sequenzelemente sowie ein internes Segment, das zu der zu detektierenden Targetsequenz komplementär ist. Unter bestimmten Reaktionsbedingungen werden durch die Aktivität der  $Q_\beta$ -Replikase nur solche Moleküle kopiert, die mit der entsprechenden Targetsequenz in der zugegebenen Probe hybridisieren. Die erzeugten Kopien dienen anschließend in nachfolgenden Syntheseschritten zusammen mit dem Ausgangsmolekül als Template für weitere Replikationszyklen. Auf diese Weise kann eine  $10^8$ -fache Amplifikation der Sondenmoleküle während 15 Minuten Inkubationen bei einer festgesetzten Temperatur erreicht werden.

- 6 -

Sämtliche bekannten Amplifikationstechniken erfordern entweder die Hybridisierung eines als Sonde dienenden Primermoleküls an die Targetsequenz oder den Einsatz spezieller Replikationsproteine aus Bakteriophagen (protein-primed amplification). Es wäre äußerst wünschenswert, über ein Amplifikationsverfahren verfügen zu können, das ohne die Hybridisierung spezifischer Oligonukleotidprimer an das zu amplifizierende Nukleinsäuremoleküle auskommt und auch die oben beschriebene, komplexe Replikationsmechanerie aus Bakteriophagen nicht erfordert. Ein solches Verfahren, das somit theoretisch die Synthese und Amplifikation jeder beliebigen Nukleinsäure ermöglichen würde, wäre für zahlreiche Anwendungen, beispielsweise auf den Gebieten der molekularen Biotechnologie, insbesondere der gentechnischen *in vitro*-Behandlung von Nukleinsäuren, der evolutiven Biotechnologie, der kombinatorischen Chemie und der molekularen Informationsverarbeitung von unschätzbarem Wert. Ein solches Verfahren könnte auch in Kombination mit bekannten primerabhängigen Amplifikationsmethoden angewandt werden, insbesondere wenn spezifische Sequenzen amplifiziert werden sollen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen, das die Synthese und gegebenenfalls Amplifikation von Nukleinsäuren ermöglicht, ohne daß hierzu eine Hybridisierung komplementärer Nukleinsäuremoleküle an die zu kopierende Nukleinsäure stattfinden muß.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, Anwendungsmöglichkeiten für eine solche hybridisierungsunabhängige Synthese- bzw. Amplifikationstechnik aufzuzeigen.



- 7 -

Diese Aufgaben werden gemäß den unabhängigen Ansprüchen der vorliegenden Erfindung gelöst. Die Unteransprüche definieren vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung.

5

Experimentell wurde überraschend festgestellt, daß in einer Polymerase-katalysierten Reaktion die Stränge eines doppelsträngigen Templates ausgehend vom freien 3'-OH einer einzelsträngigen Nukleinsäure (Initiator) 10 kopiert werden, wobei die Reaktion im Unterschied zu allen bisher bekannten Reaktionen dieser Art an doppelsträngigen DNA-Molekülen keine Hybridisierung der einzelsträngigen Nukleinsäure an das Template beinhaltet.

15

Ausgangspunkt für diese Beobachtung waren Versuche, in denen ein doppelsträngiges Template mittels der oben beschriebenen 3SR-Reaktion amplifiziert wurde. Die Reaktion enthielt neben dNTPs und NTPs, Puffer und 20 Template zwei unphosphorylierte Oligonukleotidprimer mit einer Länge von je 20 Basenpaaren, eine Reverse Transkriptase und T7-RNA-Polymerase. Unter bestimmten Reaktionsbedingungen zeichneten sich die erhaltenen doppelsträngigen Reaktionsprodukte dadurch aus, daß sie 25 in Schritten von 20 Basenpaaren verlängert waren. Die Reaktionsprodukte wurden kloniert und einer Sequenzanalyse unterzogen. Diese Sequenzanalyse zeigte, daß diese Moleküle neben der erwarteten Templatesequenz an deren Enden mehrere Kopien der beiden Primersequenzen 30 als direkte Wiederholungen enthielten. Template- und Primersequenz sowie die Primersequenzen untereinander waren größtenteils unmittelbar, d.h. ohne Überlappung, miteinander verknüpft bzw. zeigten eine Deletion bzw. Insertion von einzelnen Basen an der Verknüpfungs- 35 stelle. Nachfolgend durchgeführte Amplifikations-

- 8 -

experimente, bei denen unter gleichen Bedingungen nur die Oligonukleotidprimer, jedoch kein Template zugegeben wurden, führten zur Bildung von repetitiven DNA-Molekülen, deren Länge in Schritten von 20 Basen-

5 paaren variierte. Sie enthielten ein zentrales Element von 33 Basen Länge, das durch Hybridisierung von zwei Kopien eines der beiden Primer über die 3'-Enden und nachfolgendes Auffüllen zum Doppelstrang entstand, sowie eine Vielzahl direkt miteinander fusionierter

10 Sequenzen der beiden Primer.

Die in diesen und weiteren Experimenten gewonnenen Daten, die in den nachfolgenden Ausführungsbeispielen ergänzend erläutert werden, lassen auf einen Reaktions-

15 mechanismus schließen, bei dem die eingesetzte Polymerase in einer Template-abhängigen Reaktion sehr effektiv einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle mit freiem 3'-OH verlängert, ohne daß die einzelsträngige Nukleinsäure mit dem Template hybridisiert. Die Sequenz

20 des Einzelstranges muß somit keinerlei Homologie zur Templatesequenz besitzen. Der Einzelstrang wirkt daher nicht als typischer Primer, sondern kann besser als Initiator bezeichnet werden. Als Template dient lineare doppelsträngige DNA. Das Reaktionsprodukt enthält die

25 Sequenz des Initiators, die direkt mit dem 5'-Ende des Templates fusioniert ist. Der Prozeß wird iterativ durchlaufen und resultiert in immer längeren Sequenzen und einer Netto-Amplifikation des Templates. Um den Unterschied zu hybridisierungsabhängigen Amplifika-

30 tionsschemata zu verdeutlichen, kann die Reaktion somit als initiatorgesteuerte oder initiatorabhängige Amplifikation ("initiator directed amplification" oder "initiator dependent amplification", IDA) bezeichnet werden.

35

- 9 -

Ohne die Erfindung an eine theoretische Erklärung binden zu wollen, wird gegenwärtig der in Abbildung 1 veranschaulichte Reaktionsmechanismus angenommen. Das Schema zeigt den vermuteten Mechanismus der IDA-

5 Reaktion für die ersten zwei Reaktionszyklen. Die Polymerase bindet gleichzeitig sowohl das Ende des doppelsträngigen Templates als auch das einzelsträngige Initiator-molekül (vertikal schraffiert). Das 3'-Ende des Templates wird verlängert, so daß der Initiator zum

10 Doppelstrang aufgefüllt wird. Ausgehend vom 3'-Ende des Initiators erfolgt eine Synthese in den DNA-Doppelstrang hinein, die je nach Bindung von Polymerase und Initiator entweder "linksseitig" (schwarze Pfeile) oder "rechtsseitig" (horizontal schraffierte Pfeile) erfol-

15 gen kann. Ein Strang dient dabei als Template, der andere wird vermutlich als Einzelstrang abgelöst. Resultat der Reaktion ist ein DNA-Doppelstrang, bei dem die Sequenz des ursprünglichen Doppelstrangtemplates direkt mit der des Initiators fusioniert ist. Die im

20 "linksseitigen" und "rechtsseitigen" Zyklus entstehenden Einzelstränge sind komplementär und können zum Doppelstrang hybridisieren (graue Pfeile). Im zweiten Zyklus kann ausgehend vom "linksseitig" oder "rechtsseitig" (Pfeile in Klammern, nicht gezeigt)

25 verlängerten Template wiederum eine "linksseitige" (schwarze Pfeile) oder "rechtsseitige" (horizontal schraffierte Pfeile) Verlängerung erfolgen. Der Mechanismus ist ähnlich wie in dem ersten Zyklus, wobei ein Teil der Einzelstränge jedoch die zum Initiator

30 komplementäre Sequenz enthält. Diese Einzelstränge können nach Bindung des Initiators als Primer durch die Polymerase zum Doppelstrang aufgefüllt werden (schräg schraffierte Pfeile).

- 10 -

Die Abbildung stellt ein idealisiertes und vereinfachtes Schema dar. In der Realität ist die Reaktion voraussichtlich wesentlich komplexer, da mehrere Zyklen an einem Molekül gleichzeitig ablaufen können und  
5 wesentlich mehr Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen den einzelsträngigen Intermediaten bestehen als in der Darstellung gezeigt. In jedem Fall verdeutlicht das in Abbildung 1 dargestellte Reaktionsschema die beobachtete Entstehung von repetitiven Sequenzen sowie  
10 die beobachtete Fusionierung von DNA-Sequenzen ohne Sequenzhomologie. Diese Beobachtungen können mit herkömmlichen Synthesemechanismen nicht erklärt werden; eine Polymerase-katalysierte template-abhängige Primerverlängerung ohne Hybridisierung zwischen Primer  
15 und Template wird durch die vorliegende Erfindung erstmals bereitgestellt.

Die erfindungsgemäße IDA-Reaktion ist isothermal und führt durch iterative Wiederholung zu einer Netto-  
20 Amplifikation. Eine vorteilhafte Eigenschaft dieser Reaktion besteht vor allem darin, daß sie von einer spezifischen Hybridisierung unabhängig ist, wodurch im Verlauf der Reaktion potentiell jede beliebige Sequenz mit jeder anderen fusioniert werden kann. Darüber  
25 hinaus ermöglicht die IDA-Reaktion die Synthese an doppelsträngigen Templatemolekülen. Durch diese einzigartige Kombination der Eigenschaften besitzt die Reaktion ein großes Anwendungspotential und eröffnet völlig neue Möglichkeiten für sämtliche Bereiche der  
30 gentechnischen *in vitro*-Behandlung von Nukleinsäuren, der evolutiven Biotechnologie sowie verwandter Aufgabenfelder.

So kann die erfindungsgemäße IDA-Reaktion allgemein zur  
35 Amplifikation von Nukleinsäuren eingesetzt werden. Der

- 11 -

- Vorteil der Reaktion gegenüber allen bekannten Amplifikationsmethoden besteht insbesondere in ihrer Unabhängigkeit von der Struktur der Enden des Templates. Dadurch entfällt die Notwendigkeit, für  
5 jedes spezifische Amplifikationsproblem spezifische Primersequenzen herstellen zu müssen. Ebenso können mit Hilfe der IDA-Reaktion Pools von Nukleinsäuren mit heterologen Enden in einer einzigen Reaktion amplifiziert werden.
- 10 Versuche haben bestätigt, daß die erfindungsgemäße Reaktion allein als Amplifikationsmethode dienen kann. Hierbei kann die schrittweise Verlängerung des Templates während der Reaktion durch Zusatz einer  
15 Restriktase, durch deren Aktivität das 5'-Ende des Templates regeneriert wird, verhindert werden. Dieser Effekt könnte auch durch den Einsatz von RNA-Initiatormolekülen in Kombination mit einem RNA-abbauenden Enzym, beispielsweise RNase, erreicht  
20 werden. In diesem Fall würde der RNA-Initiator nach Auffüllen zum Doppelstrang zumindest partiell durch eine RNase abgebaut werden. Als Initiator-nukleinsäure können auch Nukleinsäureanaloga, beispielsweise Peptide Nucleic Acid (PNA; Wittung et al. (1994) Nature 368,  
25 561-563), eingesetzt werden.
- Darüber hinaus kann die erfindungsgemäße Reaktion auch einer PCR oder einer anderen primerabhängigen Amplifikationsreaktion vorgeschaltet werden. Im ersten Schritt  
30 wird dadurch das jeweilige Template mit der Initiatorsequenz fusioniert. Anschließend erfolgt eine spezifische Amplifikation, bei der die Initiatoren als Primer eingesetzt werden können.
- 35 Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften kann die erfin-

- 12 -

5        dungsgemäße Reaktion für zahlreiche Anwendungen eingesetzt werden, die durch bereits etablierte Amplifikationstechniken nicht abgedeckt werden. Beispielfhaft seien hier die Amplifikation bzw. das Kopieren von  
10        Total-DNA oder Nukleinsäuregemischen, z.B. für diagnostische Zwecke oder im Zusammenhang mit Methoden der *in vitro*-Evolution (z.B. die primerunabhängige Amplifikation in SELEX-Prozessen ("systemic evolution of ligands by exponential enrichment"; vlg. z.B. WO  
15        95/30775) oder andere *in vitro*-Selektionsverfahren) genannt. Es ergibt sich von selbst, daß die erfindungsgemäße Reaktion allgemein in jedem beliebigen Prozeß eingesetzt werden kann, bei dem die Vervielfältigung sämtlicher in einer Probe enthaltenen Nukleinsäure-  
20        moleküle oder allgemein eine zufällige Synthese und Amplifikation von Nukleinsäuremolekülen erwünscht ist.

Alternativ zu oder gemeinsam mit doppelsträngigen Nukleinsäuren können ebenso einzelsträngige Nukleinsäuren als Ausgangstemplate dienen. In diesem Fall kann  
25        z.B. eine Initiatornukleinsäure eingesetzt werden, die zu dem 3'-Ende des zu kopierenden Einzelstranges komplementär ist, so daß durch Hybridisierung der Initiatornukleinsäure an das Templatemolekül und  
30        anschließende Polymerase-katalysierte Auffüllung des Doppelstranges ein doppelsträngiges Template entsteht, das anschließend nach dem erfindungsgemäßen IDA-Mechanismus amplifiziert wird. Dieses Verfahren könnte zur Umschreibung von RNA in doppelsträngige DNA bei  
35        gleichzeitiger Amplifikation eingesetzt werden und würde somit eine Alternative zur RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) darstellen.

Allgemein kann die erfindungsgemäße Reaktion darüber  
35        hinaus als Grundlage für alle Verfahren und Prozesse

- 13 -

dienen, die bislang auf Kopiervorgängen basierten, die einen sequenzspezifischen Vorgang als Startreaktion benötigten. Solche Verfahren umfassen z.B. auch Sequenzierungs- und footprint-Methoden, die Herstellung  
5 von markierten Nukleinsäuren und die Herstellung einzelsträngiger DNA, die z.B. mit Selektionsverfahren (z.B. SELEX-Prozesse) gekoppelt werden kann.

Des weiteren kann die erfindungsgemäße IDA-Reaktion zur  
10 Fusionierung von nichtkomplementären Nukleinsäuren eingesetzt werden. Dadurch eröffnet sie eine Reihe neuer Möglichkeiten, insbesondere für die molekulare Biotechnologie. So gestattet das erfindungsgemäße Verfahren beispielsweise die Herstellung von Random-  
15 Sequenzen aus kurzen randomisierten Oligonukleotiden und damit die Erschließung von Sequenzräumen, die bisher praktisch nicht zugänglich waren.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der enzymatischen  
20 Template-unabhängigen Synthese von Oligonukleotiden. Diese Anwendung eröffnet ein weites Feld von Möglichkeiten in der kombinatorischen Chemie sowie für die molekulare Informationsverarbeitung (DNA-computing,  
25 DNA-chip-Technologie). Im Zusammenwirken mit Prozessen, die eine Rekombination von Nukleinsäuren zur Folge haben, können dabei Sequenzen beliebiger Sequenz und Länge erzeugt werden. Ebenso ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Herstellung langer  
30 doppelsträngiger DNA-Moleküle (beispielsweise synthetischer Gene) aus Einzelsträngen ohne Sequenzkomplementarität.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten des erfindungsgemäßen  
35 Verfahrens liegen in der Herstellung von spezifischen

- 14 -

proteinkodierenden Sequenzen durch gesteuerte oder randomisierte Fusion von verschiedenen Codon-Bausteinen. Das gesamte Spektrum proteinogener Aminosäuren kann mit 21 Bausteinen abgedeckt werden. So wäre  
5 beispielsweise eine Kopplung der erfindungsgemäßen Reaktion mit Translationsmethoden möglich, so daß gleichzeitig die für das Protein kodierende Sequenz, als auch das Protein selbst hergestellt werden. Solche Translationsmethoden umfassen sowohl das klassische  
10 Translationsverfahren (siehe beispielsweise Baranov et al. (1989) Gene 84, 463-466; Morozov et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9325-9329), als auch Verfahren, die auf alternativen Mechanismen beruhen, wie beispielsweise die Ribozym-katalysierte Synthese  
15 von Proteinen, an deren Entwicklung gegenwärtig intensiv gearbeitet wird (siehe z.B. Illangasekare et al. (1995) Science 267, 643-647; Lohse und Szostak (1996) Nature 381, 442-444; Hager et al. (1996) Chem. Biol. 3, 717-725), wobei das Ribozym identisch mit der  
20 im jeweiligen Schritt fusionierten Nukleinsäure sein kann.

Besonders wertvoll ist die erfindungsgemäße IDA-Methode im Zusammenhang mit shuffling-Technologien (vgl. beispielsweise Stemmer (1994) Nature 370, 389-391; Stemmer  
25 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10747-10757; WO-A1-95/22625). Die IDA-Methode gestattet das shuffling von DNA-Fragmenten ohne Sequenzhomologie. Ein dosierter Einsatz in Kombination mit sequenzspezifischem  
30 shuffling würde den globalen Umbau von Biomolekülen erlauben. Diese Technik ist sowohl für Proteine, als auch für funktionelle Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloge anwendbar. Dadurch wäre es einerseits möglich, multifunktionale Biomoleküle auf eine gewünschte Form  
35 zu optimieren und mit geeigneten Selektionsverfahren



- 15 -

unerwünschte Funktionen zu beseitigen. Andererseits könnten verschiedene Biomoleküle mit unterschiedlicher Funktion und Struktur miteinander so fusioniert werden, daß ineinandergeschaltete multifunktionale Moleküle entstehen. Ergebnis dieses neuen Verfahrens können multifunktionale Proteine, katalytische Nukleinsäuren oder Aptamere sein.

Diese beispielhafte Auflistung möglicher Anwendungsgebiete des erfindungsgemäßen Verfahrens macht das große Potential der IDA-Methode deutlich. Umso bemerkenswerter ist die verhältnismäßig einfache Durchführung des Verfahrens und die geringe Anzahl der hierzu erforderlichen Komponenten.

Erfindungsgemäß läuft die IDA-Reaktion in einem Reaktionsansatz ab, der folgende Komponenten enthält: ein Enzym mit Polymerase-Aktivität, d.h. ein Enzym, das die Synthese von Nukleinsäuremolekülen aus kleineren Bausteinen katalysiert, die entsprechenden Bausteine bzw. Monomere, üblicherweise also dATP, dCTP, dGTP und dTTP (ggf. in modifizierter Form), mindestens eine am 3'-Ende einen einzelsträngigen Bereich aufweisende Initiatornukleinsäure und mindestens ein lineares Templatenukleinsäuremolekül. Dabei kann das lineare Template auch auf zwei Kopien eines Initiatormoleküls beruhen.

Entsprechend enthält ein typischer IDA-Reaktionsansatz folgende Komponenten:

40	mM Tris pH 7,5
15	mM MgCl <sub>2</sub>
	16,6 mM NaCl
35	1 mM dNTPs, d.h. ein Gemisch aus jeweils 1 mM

- 16 -

dATP, dGTP, dCTP und dTTP

0,4 mg/ml BSA (Rinderserumalbumin)

20  $\mu$ M Initiatornukleinsäure

20 nM Templatenukleinsäure

- 5 0,25 mg/ml Polymerase, beispielsweise HIV-I-Reverse Transkriptase (Heterodimer aus p66- und p51-Untereinheit, beide N-terminal mit einem Histidin-Tag versehen; vgl. Le Grice et al. (1995) Methods Enzymol. 262, 130-144)
- 10

- Üblicherweise wird das Enzym mit Polymerase-Aktivität in einer Konzentration von 40 mg/ml bis  $10^{-6}$  mg/ml eingesetzt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform
- 15 wird das Enzym in einer Endkonzentration von 4 mg/ml bis  $10^{-5}$  mg/ml eingesetzt, wobei eine Endkonzentration von 0,4 mg/ml bis 0,002 mg/ml besonders bevorzugt ist.

- Erfindungsgemäß wird eine beliebige einzelsträngige
- 20 Nukleinsäure bzw. eine beliebige Nukleinsäure mit einem an ihrem 3'-Ende lokalisierten einzelsträngigen Bereich als Initiator eingesetzt. Generell hat die Initiator-nukleinsäure eine Länge von mindestens einem Nukleotid. Vorzugsweise wird eine Initiatornukleinsäure mit einer
- 25 Länge von mindestens drei Nukleotiden, besonders bevorzugt mit einer Länge von mindestens 15 Nukleotiden, eingesetzt.

- Üblicherweise kann die Endkonzentration der Initiator-nukleinsäure zwischen 0,2 mM und 2 pM betragen. In
- 30 einer bevorzugten Ausführungsform wird sie in einer Endkonzentration von 0,2 mM bis 20 nM und besonders bevorzugt in einer Endkonzentration von 20  $\mu$ M bis 2  $\mu$ M eingesetzt.

35

- 17 -

Das mindestens eine lineare Templatemolekül wird erfindungsgemäß in einer Endkonzentration von 0,2 mM bis zum einem einzigen Molekül in einer gegebenen Volumeneinheit eingesetzt. Vorzugsweise beträgt die  
5 Endkonzentration des Templates zwischen 5  $\mu$ M und 20 pM, besonders bevorzugt zwischen 200 nM und 2 nM.

Allgemein eignet sich jedes Enzym mit Polymeraseaktivität für den Einsatz in der IDA-Reaktion. Allerdings  
10 können sich aus der Verwendung einer bestimmten Polymerase hinsichtlich der Effizienz, mit der die Reaktion abläuft, der Endkonzentration im jeweiligen Reaktionsansatz, der speziellen Aufgabenstellung in einem bestimmten Anwendungsgebiet oder der anderen in  
15 dem Reaktionsansatz vorhandenen Komponenten Unterschiede bzw. verschiedene Anforderungen ergeben.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Polymerase um eine Reverse Transkriptase oder  
20 um eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, beispielsweise Klenow-Exo<sup>+</sup> aus *Escherichia coli* (Derbyshire et al. (1988) Science 240, 199-201), besonders bevorzugt um eine HIV-I-Reverse Transkriptase und am meisten bevorzugt um eine mit einem Histidin-Tag versehene HIV-  
25 I-Reverse Transkriptase.

Die IDA-Reaktion wird erfindungsgemäß bei einer Temperatur zwischen 0 °C und 100 °C, eventuell sogar noch darüber, durchgeführt. Bevorzugt wird eine Reaktions-  
30 temperatur zwischen 20 °C und 55 °C, besonders bevorzugt eine Reaktionstemperatur zwischen 30 °C und 45 °C. Wird eine Hitze-stabile Polymerase, wie z.B. Taq-DNA-Polymerase, eingesetzt, beträgt die Reaktionstemperatur üblicherweise mindestens 0 °C, bevorzugt  
35 mindestens 50 °C.

- 18 -

Die Dauer der Inkubation richtet sich nach den gewünschten Reaktionsprodukten, der speziellen Anwendung der IDA-Reaktion bzw. dem gewünschten Ausmaß der Amplifikation.

5

Die folgenden Ausführungsbeispiele dienen lediglich der Veranschaulichung der Erfindung.

10 Beispiel 1:

Zwei Oligonukleotide mit einer Länge von 20 Nukleotiden wurden in einer Endkonzentration von jeweils 2  $\mu$ M in 50  $\mu$ l-Reaktionsansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an HIV-I-Reverse Transkriptase für 2 h bei 42 °C  
15 inkubiert. Die Reaktionsansätze enthielten:

40 mM Tris/HCl pH 8,0  
5 mM KCl  
20 5 mM Dithiothreitol  
2 mM Spermidin  
15 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM dNTPs, d.h. ein Gemisch aus jeweils 1 mM  
dATP, dGTP, dCTP und dTTP

25

Die verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen:

5'-CCTCTGCAGACTACTATTAC-3' (P1CATCH,  
unphosphoryliert) und  
5'-CCTGAATTCTTGCTGTGACG-3' (P2CATCH, unphosphory-  
30 liert).

Als Polymerase wurde eine mit einem His-tag versehene HIV-I-Reverse Transkriptase eingesetzt, die zuvor mit Hilfe üblicher Prot inaufreinigungsmethoden präpariert  
35 worden war (vgl. Protein Purification, Princip. High

- 19 -

Res. Meth. and Appl., Janson und Ryden, VCH Publishers, New York, 1989). Diese rekombinate HIV-I-Reverse Transkriptase sowie ihre Aufreinigung und Charakterisierung ist ausführlich beschrieben in Le Grice et al. (1995)  
5 Methods Enzymol. 262, 130-144).

1/25 der Menge eines der beiden Primer wurde als fluoreszenzmarkierte Komponente zugesetzt (Primer P2CATCH, am 5'-Ende mit dem Farbstoff IRD-41 (MWG  
10 Biotech, Ebersberg) verknüpft). Zur Analyse der fluoreszenzmarkierten Reaktionsprodukte wurde 1/4 des mittels Mobispin-Säulen (MOBITEC, Göttingen) entsalzten Gesamtreaktionsansatzes auf einem 10%igen, denaturierenden Polyacrylamid-Gel in einem LI-COR-Sequenzautomaten (MWG Biotech, Ebersberg) aufgetrennt. Das  
15 Resultat der schrittweisen Verlängerung der doppelsträngigen Reaktionsprodukte um jeweils 20 Basenpaare ist in Abbildung 2 als Molekulargewichtsleiter erkennbar.

20  
Bahn 1 zeigt den Reaktionsansatz mit einer Endkonzentration an HIV-I-Reverse Transkriptase von 0,4 µg/µl, Bahn 2 mit einer Endkonzentration von 0,16 µg/µl, Bahn 3 mit einer Endkonzentration von 0,04 µg/µl und Bahn 4  
25 mit einer Endkonzentration von 0,008 µg/µl.

Für die Sequenzanalyse wurden die Reaktionsprodukte subkloniert und einzelne Klone sequenziert. Diese Analyse zeigte, daß die entstandenen Moleküle ein  
30 zentralen Element von 33 Basen Länge enthielten, das durch Selbsthybridisierung des Primers P2CATCH über das 3'-Ende und nachfolgendes Auffüllen zum Doppelstrang entstand, sowie eine Vielzahl miteinander fusionierter Sequenzen der beiden Primer.

35

- 20 -

Die initiale Doppelstrangbildung war notwendige Voraussetzung für die Oligomerisierung der Primer. Wurde die Reaktion nur mit einem Primer betrieben, dessen Sequenz eine Selbsthybridisierung ausschloß, wurden keine Produkte erhalten. Durch sukzessives Reduzieren des Reaktionsansatzes auf die unbedingt notwendigen Komponenten zeigte sich, daß die Reaktion von der Reversen Transkriptase katalysiert wurde und daß sie nur stattfand, wenn alle vier dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) anwesend waren.

In nachfolgenden Experimenten konnte bestätigt werden, daß die IDA-Reaktion nicht nur durch eine Reverse Transkriptase, sondern auch durch andere bekannten Polymerasen katalysiert wird.

#### Beispiel 2:

Iteratives Kopieren eines doppelsträngigen Templates ausgehend von einem Initiator, der homolog zu einem der beiden 5'-Enden des Templates ist:

Ein doppelsträngiges DNA-Template von 106 Basenpaar Länge (SP6CATCH) wurde in einer Endkonzentration von 20 nM in einem 50 µl-Reaktionsansatz mit HIV-I-Reverse Transkriptase (0,4 µg/µl Endkonzentration) und einem einzelsträngigen Initiator von einer Länge von 20 Basen (PlCATCH, 5 µM Endkonzentration), der zu einem der beiden 5'-Enden des Templates homolog war, für 2 h bei 42 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz enthielt weiterhin:

40	mM Tris pH 7,5
35	15 mM MgCl <sub>2</sub>

- 21 -

16,6 mM NaCl

1 mM dNTPs, d.h. ein Gemisch aus jeweils 1 mM  
dATP, dGTP, dCTP und dTTP

0,4 mg/ml BSA (Rinderserumalbumin)

5

Das verwendete Template und der verwendete Initiator  
hatten folgende Sequenzen:

Initiator: 5'-CCTCTGCAGACTACTATTAC-3'

10

(PlCATCH, unphosphoryliert, PstI-  
Erkennungssequenz unterstrichen)

Template: 5'-CCTCTGCAGACTACTATTACATAATACGACTCACTAT

15

AGGGATCTGCACGTATACTTCTATAGTGTCACCTAAATAG  
GCAGTCTGTCTGCACAGCAAGAATTCAGG-3'

(SP6CATCH, PstI- und EcoRI-Erkennungs-  
sequenzen unterstrichen).

20 Im Verlauf der Reaktion vollzog sich, ausgehend von den  
3'-Enden des Templates und des Initiators, ein  
iterativer Kopiervorgang, der mit einer schrittweisen  
Verlängerung des Templates um mehrere Initiatorkopien  
und mit einer Netto-Amplifikation verbunden war.

25

Die Reaktionsprodukte wurden mittels Mobispin-Säulen  
entsalzt und mittels Gelelektrophorese analysiert  
(Abbildung 3). Jeweils 1/10 des Gesamtreaktionsansatzes  
wurde entweder direkt (Bahn 7) oder nach Behandlung mit  
30 den Restriktionsendonukleasen EcoRI (Bahn 6), PstI  
(Bahn 5) oder PstI und EcoRI (Bahn 4) auf einem 3%igen  
Agarosegel aufgetrennt. Bahn 1 zeigt 1,5 µg einer 100  
Basenpaar-Molekulargewichtsleiter (MBI Fermentas,  
Litauen). Die Größen der relevanten Banden sind am Rand  
35 angegeben. In Bahn 2 und 3 wurde Ausgangstemplate in

- 22 -

einer Menge von 1 pmol bzw. 0,2 pmol (entspricht der Menge an Ausgangstemplate in Bahn 4-7) aufgetragen.

- Die Reaktion führt zu einer Verteilung der Reaktions-  
5 produkte über einen großen Molekulargewichtsbereich oberhalb der Ausgangstemplatelänge (Bahn 7).  
Restriktionsverdau mit *EcoRI*, dessen Erkennungssequenz nahe dem einen Ende des Templates lokalisiert ist, beseitigt die Heterogenität der Reaktionsprodukte  
10 nicht, verringert jedoch ihre Länge. Schneiden mit *PstI*, dessen Erkennungssequenz sowohl nahe dem 5'-Ende des Initiators als auch nahe dem anderen Ende des Templates lokalisiert ist, führt zu einer dominanten spezifischen Bande, die ein gegenüber dem Ausgangs-  
15 template um einige Basen verlängertes Produkt repräsentiert. Behandlung mit beiden Restriktionsenzymen führt zu einem gegenüber dem Ausgangstemplate um einige Basen verkürzten Produkt.
- 20 Die Daten unterstützen die Annahme, daß im Verlauf der Reaktion mehrere Kopien des Initiators mit beiden Seiten des Templates fusioniert wurden:
- Durch *EcoRI*-Behandlung werden nur die auf einer Seite  
25 des Templates fusionierten Initiatoren entfernt, so daß die Heterogenität der Produkte bei ihrer gleichzeitigen Verkürzung erhalten bleibt. Restriktionsverdau mit *PstI* führt auf der *PstI*-Seite des Templates zur Entfernung von 4 Basen der Templatesequenz sowie aller mit ihr  
30 fusionierten Initiatoren. Auf der *EcoRI*-Seite des Templates bleibt zusätzlich zur Templatesequenz eine um 4 Basen verkürzte Initiatorsequenz erhalten. Unter der Annahme, daß die Initiatoren direkt, d.h. ohne Überlappung mit der Templatesequenz fusioniert wurden,  
35 wird eine Länge des Produktes von 118 Basen erwartet.



- 23 -

Schneiden der Reaktionsprodukte mit *PstI* und *EcoRI* entfernt je 4 Basen des Templates sowie alle fusionierten Initiatoren auf beiden Seiten des Templates. Das resultierende Produkt hat eine erwartete  
5 Länge von 98 Basen.

Durch Klonierung der Reaktionsprodukte und anschließende Sequenzanalyse konnte eine direkte, größtenteils überlappungsfreie Fusionierung von Template und  
10 Initiatorsequenz an beiden Enden des Templates bestätigt werden, wobei in einigen Fällen eine Insertion bzw. Deletion weniger Basen detektiert wurde. Eine Netto-Amplifikation des Templates im Verlauf der Reaktion wird bei Vergleich der Bahnen 3 und 4 deut-  
15 lich.

Beispiel 3:

20 Iteratives Kopieren eines doppelsträngigen Templates ausgehend von einem zum Template nichthomologen Initiator:

Ein doppelsträngiges DNA-Template mit einer Länge von  
25 106 Basenpaaren (SP6CATCH) wurde in einer Endkonzentration von 20 nM in einem 50 µl-Reaktionsansatz mit HIV-I-Reverse Transkriptase (0,4 µg/µl Endkonzentration) und einem einzelsträngigen Initiator von 35 Basen Länge (LOOP, 20 µM Endkonzentration), der zu keinem der  
30 beiden 5'-Enden des Templates homolog war, für 2 h bei 42 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz enthielt weiterhin:

35

- 24 -

40 mM Tris pH 7,5  
15 mM MgCl<sub>2</sub>  
16,6 mM NaCl  
1 mM dNTPs, d.h. ein Gemisch aus jeweils 1 mM  
5 dATP, dGTP, dCTP und dTTP  
0,4 mg/ml BSA (Rinderserumalbumin)

Das verwendete Template und der verwendete Initiator  
hatten folgende Sequenzen:

10

Initiator: 5'-GTTGATATTTATTTAATTCATAAATAAAAATCCCT-3'  
(LOOP, unphosphoryliert)

15

Template: 5'-CCTCTGCAGACTACTATTACATAATACGACTCACTA  
TAGGGATCTGCACGTATACTTCTATAGTGTCACCTAAAT  
AGGCAGTCTGTCGTCACAGCAAGAATTCAGG-3'

(SP6CATCH, *Pst*I- und *Eco*RI-Erkennungs-  
sequenzen unterstrichen).

20

Im Verlauf der Reaktion vollzog sich, ausgehend von den  
3'-Enden des Templates und des Initiators ein  
iterativer Kopiervorgang, der mit einer schrittweisen

25

Verlängerung des Templates um mehrere Initiatorkopien  
und mit einer Netto-Amplifikation verbunden war.

Die Reaktionsprodukte wurden mittels Mobispin-Säulen  
entsalzt und mittels Gelelektrophorese analysiert  
30 (Abbildung 4). Jeweils 1/10 des Gesamtreaktionsansatzes  
wurde entweder direkt (Bahn 4) oder nach Behandlung mit  
den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI (Bahn 6), *Pst*I  
(Bahn 5) oder *Pst*I und *Eco*RI (Bahn 7) auf einem 3%igen  
Ethidiumbromid-gefärbten Agaros gel aufgetrennt. Bahn 1  
35 zeigt 1,5 µg einer 100 Basenpaar-Molekulargewichts-

- 25 -

5 leiter (MBI Fermentas, Litauen). Die Größen der relevanten Banden sind am Rand angegeben. In Bahn 2 und 3 wurde Ausgangstemplate in einer Menge von 2 pmol bzw. 0,2 pmol (entspricht der Menge an Ausgangstemplate in Bahn 4-7) aufgetragen.

10 Die Reaktion führt zu einer Verteilung der Reaktionsprodukte über einen großen Molekulargewichtsbereich oberhalb der Ausgangstemplatelänge (Bahn 4). Die Behandlung mit *EcoRI* bzw. *PstI* allein, deren Erkennungssequenzen jeweils an einem der beiden Enden des Templates lokalisiert sind, beseitigt die Heterogenität der Reaktionsprodukte nicht, verringert jedoch ihre Länge (Bahn 6 bzw. 5). Schneiden mit beiden Restriktionsenzymen führt zu einem gegenüber dem Ausgangstemplate um einige Basen verkürzten Produkt (Bahn 7).

20 Die Daten unterstützen die Annahme, daß im Verlauf der Reaktion mehrere Kopien des Initiators mit beiden Seiten des Templates fusioniert wurden:

25 Durch *EcoRI* bzw. *PstI*-Behandlung allein werden nur die auf einer Seite des Templates fusionierten Initiatoren entfernt, so daß die Heterogenität der Produkte bei ihrer gleichzeitigen Verkürzung erhalten bleibt. Ein Restriktionsverdau der Reaktionsprodukte mit *PstI* und *EcoRI* entfernt je 4 Basen des Templates sowie alle fusionierten Initiatoren auf beiden Seiten des Templates. Das resultierende Produkt hat eine erwartete Länge von 98 Basen.

35 Klonierung der Reaktionsprodukte und anschließende Sequenzanalyse bestätigten eine größtenteils überlappungsfreie Fusionierung von Template und Initiatorsequenz an beiden Enden des Templates, wobei

- 26 -

in einigen Fällen eine Insertion bzw. Deletion weniger Basen detektiert wurde. Besonders häufig wurden nach der Klonierung Mutationen innerhalb der Initiatorsequenz detektiert. Eine Netto-Amplifikation des  
5 Templates im Verlauf der Reaktion wird bei Vergleich der Bahnen 3 und 7 deutlich.

Beispiel 4:

10

Kombination der IDA-Reaktion mit einer konventionellen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) schafft die Möglichkeit, ein Template in der PCR mit Primern zu amplifizieren, die keine Homologie zum Template aufweisen.

15

Ein doppelsträngiges DNA-Template von 106 Basen Länge (SP6CATCH) wurde in einer Endkonzentration von 10 nM in einem 50 µl-Reaktionsansatz mit unterschiedlichen Mengen an HIV-I-Reverse Transkriptase und einem einzelsträngigen Initiator von 35 Basen Länge (LOOP, 10 µM Endkonzentration), der zu keinem der beiden 5'-Enden des Templates homolog war, für 10 min. bei 42 °C  
20 inkubiert. Der Reaktionsansatz enthielt weiterhin:

25

1 x Taq-Puffer (Promega, Madison, WI, USA)  
2 mM MgCl<sub>2</sub>,  
200 µM dNTPs, d.h. ein Gemisch aus jeweils 200 µM  
dATP, dGTP, dCTP und dTTP

30

Danach wurden 2,5 Einheiten Taq-Polymerase (Promega) hinzugegeben und der Reaktionsansatz mit 40 µl Mineralöl überschichtet. Der Ansatz wurde im Thermocycler über 20 Zyklen unter folgendem Temperaturregime inkubiert:

35

- 27 -

1. Zyklus: 5 min. 95 °C, 1 min. 45 °C, 1 min.  
72 °C und  
2.-20. Zyklus: 1 min. 95 °C, 1 min. 45 °C, 1 min.  
72 °C.

5

Das verwendete Template und der verwendete Initiator  
hatten folgende Sequenzen:

10 Initiator: 5'-GTTGATATTTATTTAATTCATAAATAAAAATCCCT-3'  
(LOOP, unphosphoryliert)

Template: 5'-CCTCTGCAGACTACTATTACATAATACGACTCACTAT  
AGGGATCTGCACGTATACTTCTATAGTGTCACCTAAATAG  
GCAGTCTGTCGTCACAGCAAGAATTCAGG-3'

15

(SP6CATCH, *Pst*I- und *Eco*RI-Erkennungs-  
sequenzen unterstrichen).

20 Nach Ablauf der Reaktion wurde 1/10 des Reaktionsan-  
satzes zur Analyse auf einem 3%igen Agarose-Gel  
aufgetrennt (Abbildung 5).

Abbildung 5 zeigt die Reaktionsprodukte von Parallel-  
experimenten, die sich lediglich in der Menge der  
25 zugesetzten HIV-I-Reverse Transkriptase unterschieden.  
Diese betrug 0,4 µg/µl Endkonzentration (Bahn 2), 0,12  
µg/µl Endkonzentration (Bahn 3), 0,04 µg/µl Endkonzen-  
tration (Bahn 4), 0,012 µg/µl Endkonzentration (Bahn  
5), 0,004 µg/µl Endkonzentration (Bahn 6), 0,0012 µg/µl  
30 Endkonzentration (Bahn 7) und keine Zugabe von HIV-I-  
Reverse Transkriptase (Bahn 8).

Nach Vorinkubation mit HIV-I-Reverse Transkriptase wird  
im Verlauf der PCR ein Fragment amplifiziert, dessen  
35 Länge der Summe aus Templatelänge und doppelter Länge

- 28 -

des Initiators entspricht (ca. 176 Basen). Die Amplifikation dieses Produktes ist besonders effizient bei Vorinkubation mit mittleren Konzentration an HIV-I-Reverse Transkriptase (Bahnen 4 bis 6). Vorinkubation  
5 des Templates ohne HIV-I-Reverse Transkriptase läßt das Template unverändert und führt im Verlauf der PCR nicht zu dessen Amplifikation (Bahn 8).

Die Reaktionsprodukte wurden durch Behandlung mit  
10 Restriktionsendonukleasen charakterisiert. Schneiden des Reaktionsproduktes mit *EcoRI* bzw. *PstI* allein, deren Erkennungssequenzen jeweils an einem der beiden Enden lokalisiert sind, führt zur Entfernung eines der  
15 Templates und resultiert in einer Verkürzung des Reaktionsproduktes um ca. 39 Basen. Schneiden mit beiden Enzymen führt zum Entfernen beider Initiatoren und 8 zusätzlichen Basen des Templates und somit zu einer Verkürzung des Reaktionsproduktes um ca.  
20 78 Basen.

Zur weiteren Analyse wurden die Reaktionsprodukte kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse bestätigte, daß im Verlauf der Reaktion eine direkte, größtenteils  
25 überlappungsfreie Fusionierung von Template und Initiatorsequenz an beiden Enden des Templates erfolgte, wobei in einigen Fällen eine Insertion bzw. Deletion weniger Basen detektiert wurde.

30

#### Beispiel 5:

In Analogie zu Beispiel 1 wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen eine Reaktion durchgeführt, bei  
35 der anstelle der HIV-I-Reverse Transkriptase 0,25

- 29 -

Einheiten/ $\mu$ l einer Exonuklease-defizienten Variante des großen Fragmentes der DNA-Polymerase I von *E. coli* (Klenow Exo<sup>-</sup>; Derbyshire et al. (1988) Science 240, 199-201; New England Biolabs, Schwalbach) eingesetzt wurde.

5 Als Ergebnis ergab sich eine vergleichbare Primerleiter, die auf den der IDA-Reaktion innewohnenden Reaktionsmechanismus schließen läßt.

10 Im Zusammenhang mit den eingesetzten Nukleinsäuremolekülen wurden übliche molekularbiologische Standardmethoden (Sequenzierung, Restriktionsverdau, Gelelektrophorese, etc.) eingesetzt, wie sie beispielsweise in Sambrook et al (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring

15 Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben sind. Im Zusammenhang mit proteinchemischen Methoden, beispielsweise im Verbindung mit der Aufreinigung eingesetzter Enzyme, sei auf das Manual Protein Purification, Princip. High Res. Meth. and

20 Appl., Janson und Ryden, VCH Publishers, New York, 1989 verwiesen. Der Einsatz von Restriktionsenzymen (MBI Fermentas, Litauen), Taq-Polymerase (Promega) u.ä. erfolgte nach Herstellerangaben.

25

- 30 -

ANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Synthese und gegebenenfalls  
5 Amplifikation von Nukleinsäuren,  
gekennzeichnet durch eine Polymerase-katalysierte  
Reaktion, die hybridisierungsunabhängig ist und durch  
mindestens eine zumindest am 3'-Ende einzelsträngige  
Nukleinsäure initiiert wird.
- 10
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die  
zumindest am 3'-Ende einzelsträngige Initiatornuklein-  
säure in Abhängigkeit von einer Templatessequenz  
verlängert wird.
- 15
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem  
mindestens ein Strang einer zumindest partiell doppel-  
strängigen Templatenukleinsäure ausgehend vom freien  
3'-OH der Initiatornukleinsäure kopiert wird.
- 20
4. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem mindestens  
ein Strang einer zumindest partiell doppelsträngigen  
Templatenukleinsäure in Abhängigkeit von der Initiator-  
nukleinsäure verlängert wird.
- 25
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 4, bei dem  
mindestens eine zumindest am 3'-Ende einen einzel-  
strängigen Bereich aufweisende Initiatornukleinsäure  
ausgehend vom freien 3'-OH eines zumindest partiell  
30 doppelsträngigen Templatemoleküls kopiert wird.
6. Verfahren nach einem der vorangehenden  
Ansprüche, dessen Reaktionsprodukte Nukleinsäuremole-  
küle umfassen, deren Sequenz einer um mindestens eine

35



- 31 -

Initiatornukleinsäuresequenz verlängerten Template-  
nukleinsäure entspricht.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden  
5 Ansprüche, bei dem die Initiatornukleinsäure in einer  
Endkonzentration von 0,2 mM bis 2 pM vorliegt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem die  
Initiatornukleinsäure in einer Endkonzentration von  
10 0,2 mM bis 20 nM vorliegt.

9. Verfahren nach einem der vorangehenden  
Ansprüche, bei dem die zu kopierende Templatenuklein-  
säure in einer Endkonzentration von 0,2 mM bis zu einem  
15 einzigen Molekül vorliegt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem die zu  
kopierende Templatenukleinsäure in einer Endkonzent-  
ration von 5  $\mu$ M bis 20 pM vorliegt.

20 11. Verfahren nach einem der vorangehenden  
Ansprüche, bei dem mindestens ein Enzym mit Polymerase-  
Aktivität in einer Endkonzentration von 40 mg/ml bis  
10<sup>-6</sup> mg/ml vorliegt.

25 12. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem das Enzym  
mit Polymerase-Aktivität in einer Endkonzentration von  
4 mg/ml bis 10<sup>-5</sup> mg/ml vorliegt.

30 13. Verfahren nach einem der vorangehenden  
Ansprüche, bei dem das Enzym mit Polymerase-Aktivität  
eine Reverse Transkriptase ist.

35

- 32 -

14. Verfahren nach Anspruch 13, bei dem die Reverse Transkriptase eine HIV-I-Reverse Transkriptase ist.

5           15. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem die HIV-I-Reverse Transkriptase mit einem Histidin-Tag versehen ist.

10           16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, bei dem das Enzym mit Polymerase-Aktivität eine DNA-abhängige DNA-Polymerase ist.

15           17. Verfahren nach Anspruch 16, bei dem die DNA-Polymerase Klenow Exo<sup>-</sup> aus *Escherichia coli* ist.

18. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem die Polymerase-katalysierte Reaktion isothermal ist.

20           19. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem eine sukzessive Verlängerung der Templatenukleinsäure während der Reaktion durch Zusatz einer Restriktase, durch deren Aktivität das 5'-Ende der Templatenukleinsäure regeneriert wird, verhindert  
25 wird.

20. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem mindestens eine Initiatornukleinsäure eine Ribonukleinsäure ist.

30           21. Verfahren nach Anspruch 20, bei dem der RNA-Initiator nach Auffüllen zum Doppelstrang zumindest partiell durch eine Ribonuklease abgebaut wird.

35

- 33 -

22. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem mindestens eine Initiator-nukleinsäure ein Nukleinsäureanalogon ist.

5           23. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Nukleinsäureanalogon Peptide Nucleic Acid (PNA) ist.

24. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem ein Gemisch von Templatenuk-leinsäuren kopiert und gegebenenfalls amplifiziert wird.  
10

25. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem ein Gemisch von Initiator-nukleinsäuren eingesetzt wird.  
15

26. Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, bei dem das Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche einer PCR-Reaktion oder einer anderen primerabhängigen Amplifikationsreaktion vorgeschaltet ist.  
20

27. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem Nukleinsäuremoleküle ohne Sequenzkomplementarität miteinander fusioniert werden.  
25

28. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem eine einzelsträngige Nukleinsäure als Ausgangstemplate dient und dem hybridisierungsunabhängigen Reaktionsschritt die Hybridisierung einer zum 3'-Ende des Templates komplementären Initiator-nukleinsäure an das Template und die Polymerase-katalysierte Auffüllung des Doppelstranges vorangehen.  
30

35

- 34 -

29. Verfahren zur Umschreibung von RNA in doppelsträngige DNA bei gleichzeitiger Amplifikation, umfassend das Verfahren nach Anspruch 28.

5        30. Verfahren zur sequenzunspezifischen Fusionierung von Nukleinsäuren, umfassend das Verfahren nach Anspruch 1.

10       31. Verfahren zum shuffling von DNA ohne Sequenzhomologie, umfassend das Verfahren nach Anspruch 1.

32. Verfahren zur Herstellung von Random-DNA großer Länge, umfassend das Verfahren nach Anspruch 1.

15       33. Verfahren zur enzymatischen Synthese von Oligonukleotiden beliebiger Sequenz, umfassend das Verfahren nach Anspruch 1.

20       34. Nukleinsäuremolekül, das in ein Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche hergestellt ist.

35. Zwischenprodukt, das in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 33 entsteht.

25       36. Zwischenprodukt nach Anspruch 35, das einen Komplex aus mindestens einer Nukleinsäure und mindestens einem Enzym mit Polymerase-Aktivität umfaßt.

30       37. Proteinmolekül, das unter Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 33 erzeugt worden ist, sowie ein entsprechendes Gen.

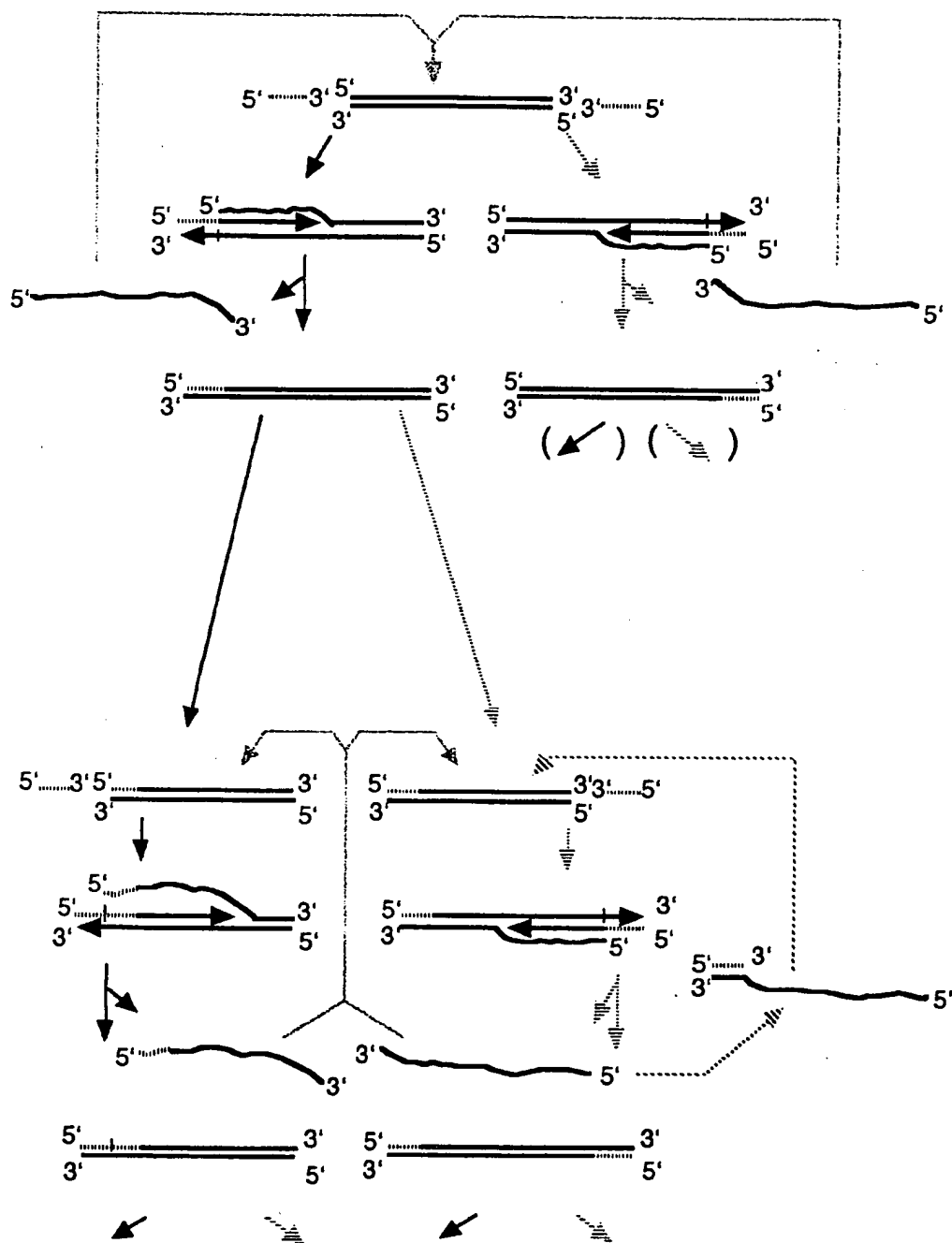
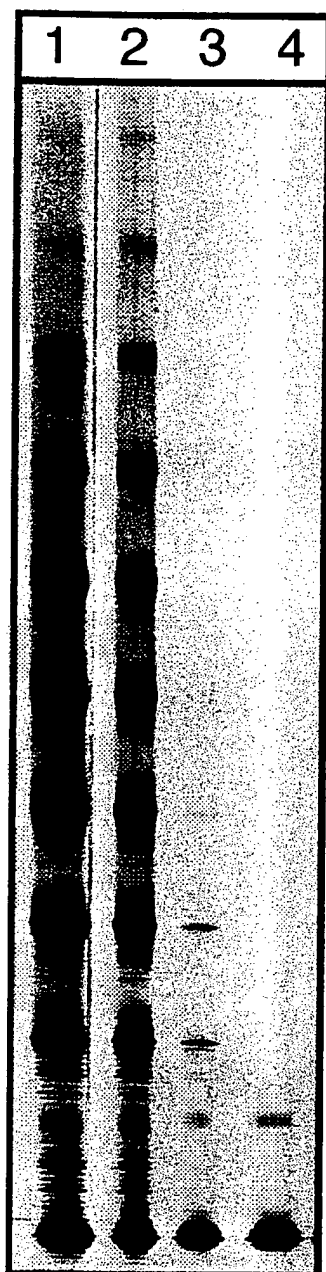


Abbildung 1



**Abbildung 2**

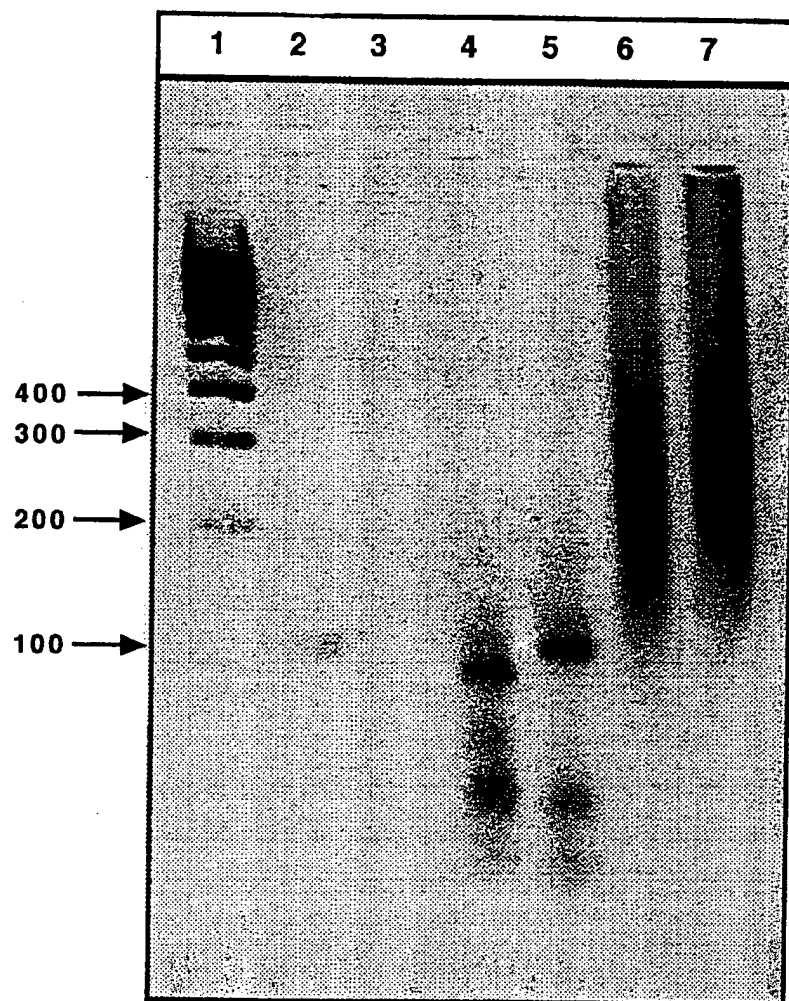


Abbildung 3

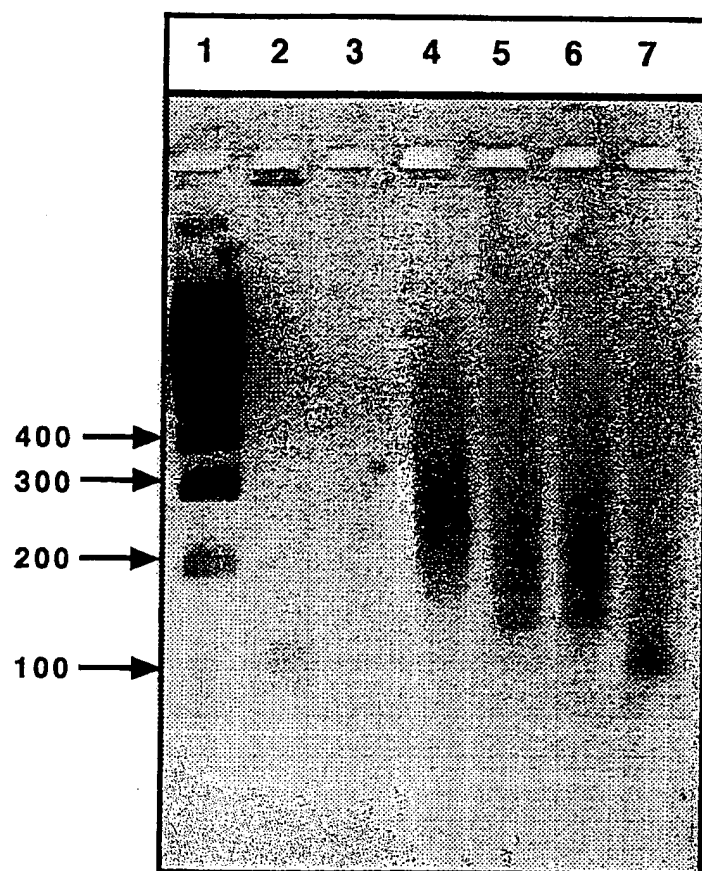
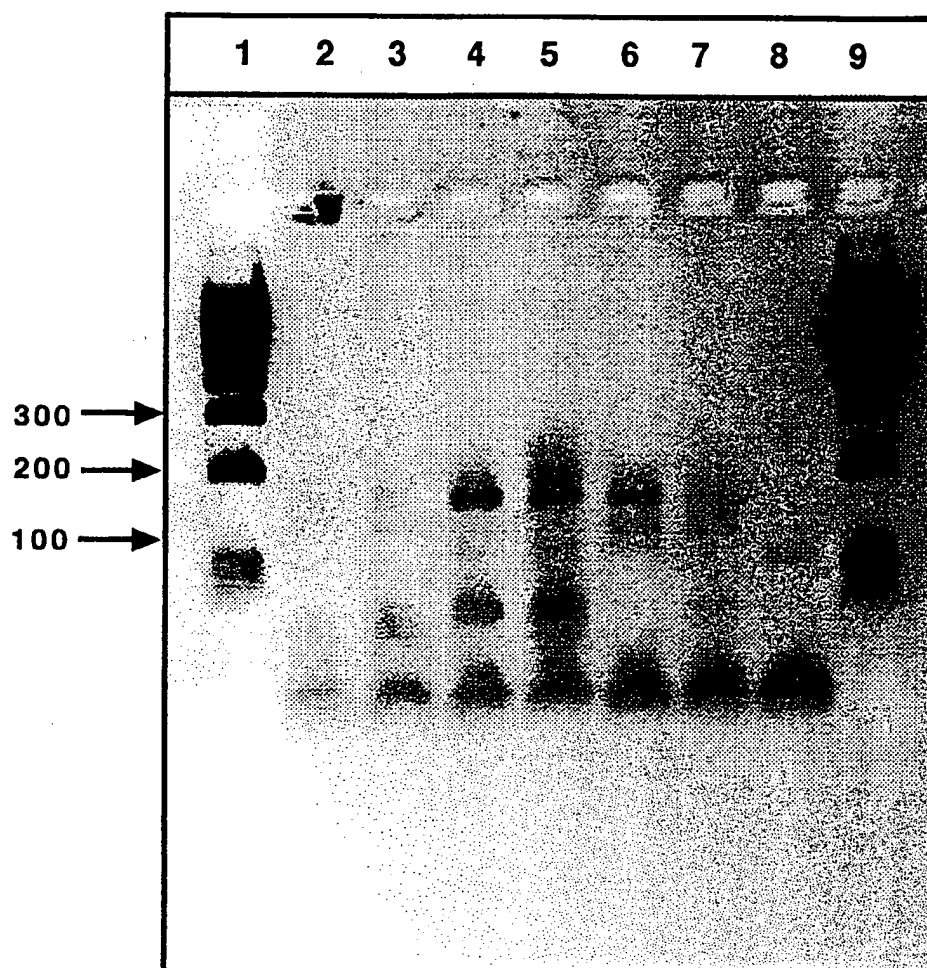


Abbildung 4



**Abbildung 5**